



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明の目的は、血管平滑筋増殖に起因する疾患、例えば、心臓の冠動脈閉塞をバルーンで拡大する治療後に起こる再閉塞等に対する、新規な予防治療剤を提供することである。本発明は、14員環マクロライド化合物、具体的には、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体を有効成分とする、血管平滑筋増殖の抑制剤、サイクリン依存性キナーゼ複合体発現増強剤、及び血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤、並びに、該疾患の治療方法等を提供する。

## 明 細 書

## 14員環マクロライド化合物を利用した、血管平滑筋の増殖に起因する疾患治療剤

## 技術分野

本発明は、14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤及びその治療方法等に関する。

## 背景技術

エリスロマイシン及びロキシスロマイシン等に代表される14員環マクロライド系化合物は、メチル側鎖等を有する14員環ラク톤にジメチルアミノ糖又は中性糖などが結合した放線菌により生産される抗生物質であり、従来から種々の感染症、たとえば、グラム陽性菌、ある種のグラム陰性菌、マイコプラズマやクラミジア等において、その強力な抗菌活性によって臨床上幅広く利用されている。その作用機序は、細菌の70Sリボソームの50Sサブユニットに作用し、ペプチド転移酵素反応を阻害して蛋白質合成を抑制するものである。

近年に至り、虚血性心疾患の患者は、健常人に比べ、肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) に対するIgG抗体価が有意に高値であるとの報告がなされている (例えば、非特許文献1参照)。

さらに、肺炎クラミジアの感染が、虚血性心疾患の発生頻度を2～4倍増加させているとの、疫学的な研究報告もなされている (例えば、非特許文献2参照)。かかる疫学結果を支持するような研究として、剖検患者の心冠動脈におけるアテローム病変部位に、当該病原体を高率に検出させるとの報告もなされている (例えば、非特許文献3参照)。

一方、マクロライド系化合物に属するラパマイシン (rapamycin) 等は、血管平

滑筋の増殖抑制活性を示すことが知られており、本活性が種々のサイトカイン等による増殖刺激を阻害することでもたらされていることが明らかとなっている（例えば、非特許文献4参照）。

〔非特許文献1〕

Saikku et al., Lancet, No.2, pp983-986, 1988

〔非特許文献2〕

Danish et al., Lancet, No.350, pp430-436, 1997

〔非特許文献3〕

Shor et al., Surgery after Medicine Journals, No.82, p158, 1992

〔非特許文献4〕

Mario et al., Z Kardiol, Supple 3, ppIII/49-III/57, 2002

発明の開示

最近では、心臓の冠動脈閉塞をバルーンで拡大する治療が行われているが、手術後に再度閉塞が起き、臨床上の問題となっている。これは血管の平滑筋が血管内膜のキズを刺激に増殖し、キズの部分の平滑筋が肥大することが原因とされている。

しかしながら、前述のラパマイシンは細胞毒性が強く、これを投与すると動物の免疫力が低下するために、種々の副作用が生じるという問題点がある。従って、特に、上記のような平滑筋の肥大を防ぐ臨床上有効な手段として使用することが出来るような、血管平滑筋への直接的な増殖阻害活性に基づく有効でかつ実用的な疾患の治療剤は未だに提供されていないのが実情である。

そこで、本発明では、上記課題を解決し、血管平滑筋増殖に起因する疾患に対する、新規な予防又は治療の為の薬剤（予防治療剤）を提供することを目的とする。

本発明者は、かかる事情に鑑み、鋭意研究した結果、ラパマイシン等の巨大な分子量を有するものではなく、14員環マクロライド系化合物が直接的に血管平滑筋増殖抑制作用を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、以下の各態様に係る発明を提供するものである。

1. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋増殖抑制剤。
2. 血管平滑筋がヒト冠血管平滑筋であることを特徴とする、態様1に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
3. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、態様1又は2に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
4. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様3記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
5. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、サイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs-p27）発現増強剤。
6. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、態様5に記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs-p27）発現増強剤。
7. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様6記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs-p27）発現増強剤。
8. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤。
9. 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症または慢性血管硬化症である、態様8記載の予防治療剤。
10. 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、又は心筋梗塞症である、態様8記載の予防治療剤。
11. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、

態様 8～10 のいずれか一項に記載の予防治療剤。

12. 前記 14 員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様 11 記載の予防治療剤。

13. 治療に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋増殖の抑制方法。

14. 細胞周期における G1 期から S 期に向かう段階を有意に抑制することとを特徴とする、態様 13 記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

15. 細胞周期における G1 期から S 期に向かう段階の抑制が、リン酸化網膜芽腫遺伝子産物の生成の抑制によってもたらされるものであることを特徴とする、態様 14 記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

16. 細胞周期における G1 期から S 期に向かう段階の抑制が、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) の発現を増強することによってもたらされるものであることを特徴とする、態様 14 又は 15 記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

17. 治療に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の治療方法。

18. 予防に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、心臓の冠動脈閉塞手術後の再開塞を防止する方法。

19. 投与工程は経口投与によって行われる、態様 13～18 のいずれか一項に記載の方法。

20. 前記 14 員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、態様 13～19 のいずれか一項に記載の方法。

21. 前記 14 員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様 20 に記載の方法。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、RXM による CASMCs 細胞への直接的増殖阻害効果を示している。図中、●はコントロールとしての実施例 1 に記載した組成の完全栄養培地 (complete

medium)、▼は完全栄養培地+RXM ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、■は完全栄養培地+RXM ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、及び、◆はこの完全栄養培地から必須栄養素であるところの牛由来血清を添加していない培地 (serum free) を、夫々示す。

縦軸は細胞密度を表すところの、光波長 450nm における吸収度 (Absorbance) である。Figure1A の横軸は培養時間を示し、Figure1B の横軸は RXM の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示す。

図 2 は、一般的抗菌剤および抗真菌剤による CSMCs 細胞への直接的増殖阻害効果を示している。図中、●はコントロールとしての実施例 1 に記載した組成の完全栄養培地 (complete medium)、▼は完全栄養培地+Gentamicin+Amphotericin B、■は完全栄養培地+ABPC ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、◆は完全栄養培地+ABPC ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、▲はこの完全栄養培地から必須栄養素であるところの牛由来血清を添加していない培地 (serum free) を、夫々示す。

縦軸は細胞密度を表すところの、光波長 450nm における吸収度 (Absorbance) であり、横軸は培養時間を示す。

図 3 は、フローサイトメトリを用いての細胞周期を解析した結果であり、上段の図が G1 期から S 期に移行 (transition) する程度を示したもので、下段の図が S 期から G2/M 期への移行の程度を示したものである。

縦軸は細胞周期の移行する程度を%で表したものであり、横軸は RXM ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) の有無を表す。

図 4 は、ウエスタンブロット法により phosphorylated Rb 蛋白質を解析した結果を示す電気泳動の写真である。

写真の左に記載された数字は phosphorylated Rb の分子量(K Dalton)を表す。写真下の「quiescent」はリン酸化されていない (非活性化状態の) Rb 分子を入れてあるレーンを示し、その隣からは RXM の濃度を示す。

図 5 は、ウエスタンブロット法により CDKIs 蛋白質 (p21 および p27) を解析した結果を示す電気泳動の写真である。

写真の左に記載された数字は CDKIs の分子量(K Dalton)を表す。上段の写真は CDKIs-p21 についての解析結果の写真であり、下段の写真は CDKIs-p27 について

のものである。写真下の「quiescent」はマイトージェン非刺激下の活性化されていない細胞から回収した（非活性化状態の）CDKIs 分子を入れてあるレーンを示し、その隣からは RXM の濃度を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の 14 員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋増殖抑制剤の好ましい態様によれば、該血管平滑筋増殖抑制剤は、血管平滑筋の細胞周期における G1 期（DNA 合成準備期）から S 期（DNA 合成期）に向かう段階を有意に抑制することを特徴とする。

本発明の増殖抑制剤の対象となる血管平滑筋は血管壁に見られ、緊張の保存と収縮にあずかる不随意筋である。その由来動物種、その部位等に関して特に制限はなく、代表的な例として、例えば、冠血管平滑筋及び大動脈血管平滑筋等を挙げることができる。本発明の増殖抑制剤は特に、ヒト冠血管平滑筋の増殖抑制に有効であり、従って、心臓の冠動脈閉塞のバルーンでの拡大治療手術後の再開塞防止に有効である。

本明細書中の実施例で示されているように、血管平滑筋の細胞周期における G1 期から S 期に向かう段階の抑制は、真核生物の細胞周期の進行に中心的な役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs）の中心的な分子である CDKIs-p27 の発現が増強されることによってもたらされるものである。従って、本発明はまた、14 員環マクロライド化合物を有効成分とする、サイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs-p27）発現増強剤に係るものである。

更に本発明は、14 員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤に係るものである。かかる疾患の代表的な例としては、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症及び慢性血管硬化症、並びに、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、及び心筋梗塞症等を挙げることができる。

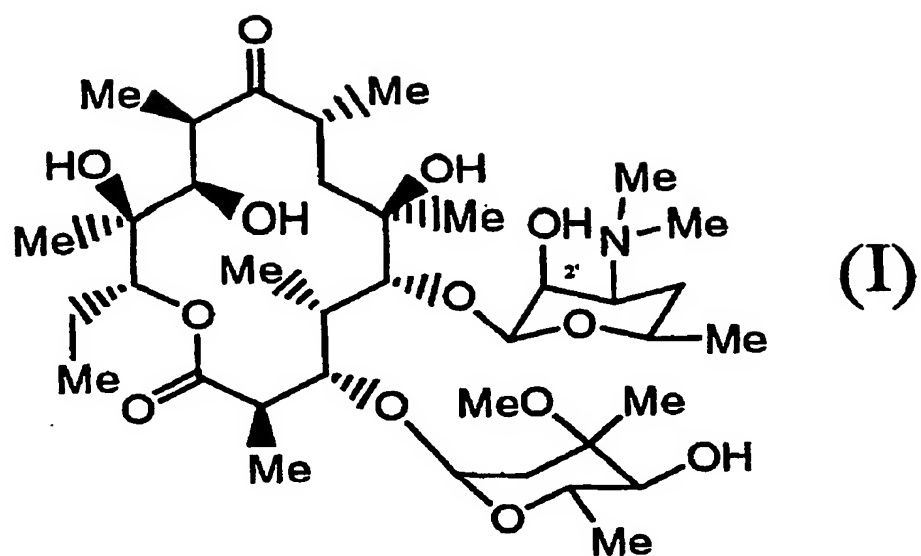
本発明は、治療に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋増殖の抑制方法に係る。本明細書中の実施例で示されているように、かかる血管平滑筋増殖の抑制は、リン酸化網膜芽腫遺伝子産物の生成の抑制によってもたらされるものであり、更にこれは、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) の発現を増強することによってもたらされるものである。本発明は、又、治療に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の治療方法に係る。更に、予防に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、心臓の冠動脈閉塞手術後の再閉塞を防止する方法にも係る。

本発明において有効成分として使用される 14 員環マクロライド化合物の種類に特に制限はなく、当業者に公知の任意の 14 員環マクロライド化合物を使用することができる。

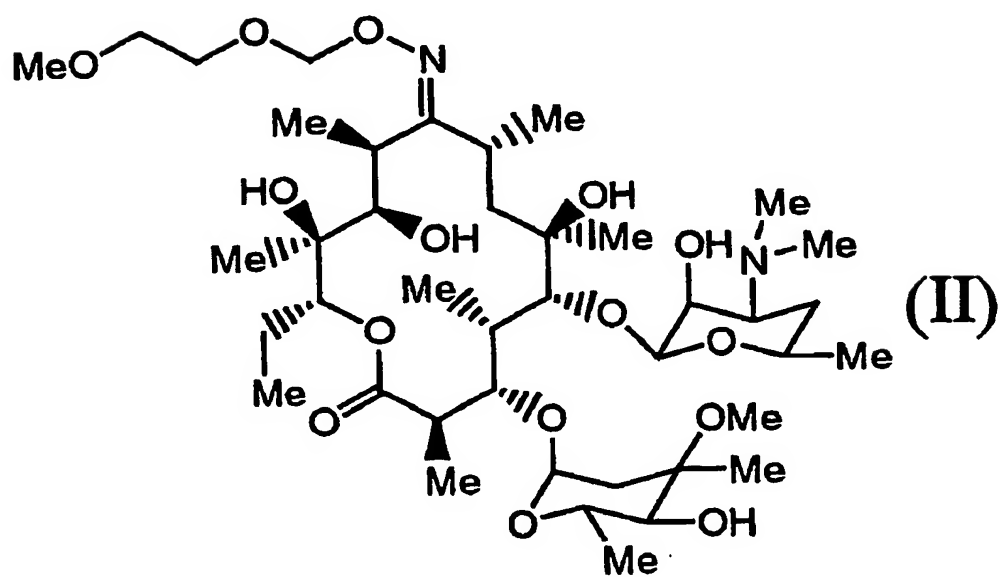
14 員環マクロライド化合物は、本発明では、下記式 (I) で表されるエリスロマイシン若しくは、下記式 (II) で表されるロキシスロマイシン、又はそれらの誘導体であることが好ましい。



[化 1]



[化 2]



かかる 14 員環マクロライド化合物は公知の化合物であり、試薬、工業原料として容易に入手可能である。因みに、エリスロマイシン塩酸塩の急性毒性（マウス LD50）は、 $425.6 \pm 15.7 \text{ mg/kg}$ （静脈）及び  $490 \pm 30.4 \text{ mg/kg}$ （腹腔）である。

本発明に用いられる 14 員環マクロライド化合物は、当業者に公知の任意の塩又はエステルを形成してもよい。かかる塩における好ましい例としては、無機酸との塩、有機酸との塩、無機塩基との塩、有機塩基との塩、酸性又は塩基性アミノ酸との塩などが挙げられる。酸、塩基は、当該化合物 1 分子に対し、0.1～5 分子の適宜な比で塩を形成する。

無機酸との塩の好ましい例としては、たとえば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などとの塩が挙げられ、有機酸との塩の好ましい例としては、たとえば、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、ステアリン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。

無機塩基との塩の好ましい例としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。また、有機塩基との塩の好ましい例としては、たとえば、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、メグルミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

酸性アミノ酸との塩の好ましい例としては、たとえば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられ、塩基性アミノ酸との塩の好ましい例としては、たとえば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられる。

エステル体の例としては、2'-アセチルエステル体、及び油脂（各種脂肪酸とのエステル体）等を挙げることが出来る。

又、14員環マクロライド化合物の「誘導體」とは、当業者に公知の任意の誘導體、例えば、各種エリスロマイシン誘導體を意味する。

本発明に用いられる化合物を予防治療剤として使用する場合は特に限定されず、経口投与若しくは非経口投与（たとえば、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、鼻腔などへの粘膜投与、または吸入投与など）のいずれでもよい。

本発明方法における活性成分の有効な投与量は、症状の程度、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与の時期、間隔、医薬製剤の性質、調剤などを総合的に勘案して適宜選択することができる。投与量は、特に限定されないが、通常成人1日あたり約0.1～2000mg、好ましくは約1～1000mgであり、より好ましくは10～500mgであり、これを、通例、1日1～4回にわけて投与する。1日1回投与の場合の投与量合計が0.1mg以下では予防治療効果が得られず、1日4回投与での投与量合計が2000mg以上では、薬剤の血中濃度が上昇し、発疹等を引き起こすおそれがある。

本発明の各薬剤は、当業者に公知の任意の方法に従って製造することが出来る。その形態は投与経路等に応じて適宜選択することが出来、例えば、経口投与のための製剤としては、たとえば、錠剤、カプセル剤、細粒剤、粉末剤、顆粒剤、口腔内崩壊錠、液剤、シロップ剤などが挙げられ、非経口投与のための製剤としては、たとえば、注射剤、点滴剤、坐薬、吸入剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、点鼻剤、点耳剤などが挙げられる。尚、これら薬剤にはその形態等に応じて、製薬業界において通常使用されるような、当業者に公知の任意の各種補助物質を適宜含むことが出来る。又、これら薬剤中の活性成分の含有量は、その形態等にもよるが、通常、1～10重量%程度である。

### [実施例]

以下の実施例では、ヒト冠血管平滑筋細胞である CASMCs 細胞の培養実験、CASMCs 細胞増殖阻害試験、細胞周期解析法、ウエスタンブロット法等を利用して、本発明で使用される 14 員環マクロライド化合物が血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を有することを示して、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されない。

#### 実施例 1

CASMCs 細胞培養法：ヒト冠血管平滑筋細胞 (CASMCs) を Clonetics 社より購入し、付属の培養キット (SmGM-2) を用いて 37°C の 5 %CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、細胞培養液中には 5 %牛胎児血清、2ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF)、5  $\mu$ g/ml 牛インシュリン、0.5ng/ml ヒト上皮増殖因子 (FGF) 等を添加して培養を行った。

#### 実施例 2

CASMCs 細胞増殖阻害試験：CASMCs 細胞を前記の方法によって 96 穴プレートに培養し、一定時間経過後細胞が 70 ~ 80 % 近く各穴の培養面を埋めてきた時点において、24 時間の血清非存在条件下による細胞の栄養枯渇状態を設定させて後、被検物質であるロキシスロマイシン (RXM) を種々の濃度 (0.1, 1.0, 10, 100  $\mu$ g/ml) で添加し、被検物質の添加後 24 時間から 72 時間の培養後、各経過時点での細胞の増殖程度を、タカラ Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System Kit を用いて、WST-1 試薬によるフォルマザン形成発色試験方法によって比色定量した。具体的には、Premix WST-1 を 10  $\mu$ l ずつ加え、2 - 4 時間後に 440 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

図 1 の Figure1A に示されるように、RXM は CASMCs 細胞の増殖を、陰性コントロールである RXM 非添加群と比して、RXM が 1 および 10  $\mu$ g/ml の両濃度において、経時観察を行った時点のいずれにおいても、統計的に有意なレベルで増

殖阻害を示した。

又、図1のFigure1Bに示されるように、RXMはCASMCS細胞の増殖を、陰性コントロールであるRXM非添加群と比して、RXMが1～100 $\mu$ g/mlの濃度に渡って、薬物濃度依存的に統計的有意なレベルで増殖阻害を示した。

### 実施例3

CASMCS細胞増殖阻害試験（その他の抗菌剤）：一方、その他の抗菌剤を被検物質として用いて同様な試験系で行ったところ、図2に示されるように、抗菌剤の代表であるAmpicilin (ABPC; 50 $\mu$ g/ml) およびGentamicin (50 $\mu$ g/ml)、さらに抗真菌剤の代表的薬剤のAmphotericin B (50 ng/ml) などはCASMCS細胞の増殖に対して、24～72時間のいずれの観察時点においても阻害作用を示すことはなかった。

### 実施例4

細胞周期解析法：上記で示されてきた、RXMのCASMCS細胞への直接的増殖阻害作用が、細胞周期におけるいかなる時点で効果を現しているかについて、フローサイトメトリを用いた実験によって、さらなる検討を行った。

具体的には、以下の手順及び条件でフローサイトメトリを用いた測定を行った。70%エタノールで30分間固定後、RNase (5 $\mu$ g/ml)で30分間インキュベートした。その後、propidium iodide (10 $\mu$ g/ml)で30分間インキュベートし、FACScan (Becton Dickinson 社)で測定した。

尚、細胞周期の移行する程度は、具体的には、ModFit LT ソフトウェアでDNAヒストグラム解析を行い、全体の細胞に対する%で示した。

図3に示されるように、RXMの10 $\mu$ g/mlの濃度において、細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階を統計的に有意なレベルで抑制していることが示されたが、一方、細胞周期のS期からG2/M期に向かう段階には阻害作用が認め

られなかった。

#### 実施例 5

ウエスタンブロット法(1): 上記の RXM による CASMCs 細胞における G1 期から S 期に向かう段階の抑制が、本細胞周期移行に必須の細胞内分子であるとされているリン酸化網膜芽腫遺伝子産物 (retinoblastoma gene products : phosphorylated Rb) を指標として、本分子のリン酸化の阻害に基づくものであるかを、ウエスタン・ブロッティング法において phosphorylated Rb を特異的に認識するモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology 社製) を用いて解析した。

この実験において、phosphorylated Rb は通常の条件下ではウエスタン・ブロット法では検出出来ないレベルであるため、5 %牛胎児血清 (FBS), 2ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (human basic fibroblast growth factor), 5  $\mu$ g/ml 牛インシュリン、及び 0.5 ng/ml ヒト上皮増殖因子 (human epidermal growth factor) を培養液に添加することによって、CASMCs 細胞をマイトージェンにより刺激し、活性化状態を生起させ phosphorylated Rb 発現量を増加させた状態において後、解析を行った。

具体的には、以下の手順でウエスタン・ブロットを実施した。

SDS ゲルで電気泳動後 PVDF 膜に転写し、ドライミルクでブロッキング後、一次抗体 (抗 phosphorylated Rb ウサギ抗体) 及び標識二次抗体 (抗ウサギ IgG マウス抗体) で順次インキュベートとした。その後、アルカリフォスファターゼイムノブロットキットを用いて発色させ、デンシトメーターで定量した。これら各操作における実施条件は当業者に公知の標準的なものである。

その結果、図 4 に示されるように RXM の 1 ~ 10  $\mu$ g/ml の濃度において CASMCs 細胞におけるリン酸化 Rb の生成を明瞭に抑制していることが示された。

#### 実施例 6

ウエスタン・ブロット法（２）：上記 RXM による CASMCs 細胞における phosphorylated Rb の生成阻害が、如何なる細胞内分子を修飾することで生起しているかを検討する目的で、当該細胞内分子を制御する分子として知られているサイクリン依存性キナーゼ複合体(CDKIs)に着目し、その中心的分子である CDKIs-p27 および CDKIs-p21 について、実施例 5 と同様な条件下でウエスタン・ブロット法によって解析を行った。

CDKIs-p27 および CDKIs-p21 分子は phosphorylated Rb と同様に、通常の細胞では発現は弱くウエスタン・ブロット法によっても検出出来ないレベルであるため、実施例 5 と同様な条件下でマイトージェンによって細胞を活性化状態にしたものを解析の対象とした。

その結果、図 5 に示されるように、RXM の  $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  の濃度において、CASMCs 細胞におけるマイトージェン刺激存在下における CDKIs-p27 の発現は、RXM の濃度依存的に明瞭に増加していたが、一方、CDKIs-p21 の発現には明瞭な差異が認められなかった。

こうしたウエスタン・ブロット法を用いた細胞内分子の解析の結果、RXM による CASMCs 細胞への直接的増殖阻害活性は、主として、サイクリン依存性キナーゼ複合体のなかの CDKIs-p27 の発現増強効果によってもたらされた、細胞周期移行における G1 から S 期への移行阻害に基づくものであることが示された。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、14員環マクロライド化合物は血管平滑筋細胞の増殖を抑制するため、14員環マクロライド化合物を有効成分として含有する血管平滑筋の増殖に起因する疾患、例えば、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症及び慢性血管硬化症、並びに、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、及び心筋梗塞症等に対する有効な予防治療剤が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋増殖抑制剤。
2. 血管平滑筋がヒト冠血管平滑筋であることを特徴とする、請求項1に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
3. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項1又は2に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
4. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項3に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
5. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、サイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs-p27）発現増強剤。
6. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項5に記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs-p27）発現増強剤。
7. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項6に記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体（CDKIs-p27）発現増強剤。
8. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤。
9. 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症または慢性血管硬化症である、請求項8記載の予防治療剤。
10. 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、又は心筋梗塞症である、請求項8記載の予防治療剤。
11. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項8～10のいずれか一項に記載の予防治療剤。
12. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項11記載の予防治療剤。



13. 治療に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋増殖の抑制方法。

14. 細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階を有意に抑制することの特徴とする、請求項13記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

15. 細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階の抑制が、リン酸化網膜芽腫遺伝子産物の生成の抑制によってもたらされるものであることを特徴とする、請求項14記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

16. 細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階の抑制が、サイクリン依存性キナーゼ複合体(CDKIs-p27)の発現を増強することによってもたらされるものであることを特徴とする、請求項14又は15記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

17. 治療に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の治療方法。

18. 予防に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、心臓の冠動脈閉塞手術後の再閉塞を防止する方法。

19. 前記投与工程は経口投与によって行われる、請求項13～18のいずれか一項に記載の方法。

20. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項13～19のいずれか一項に記載の方法。

21. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項20に記載の方法。

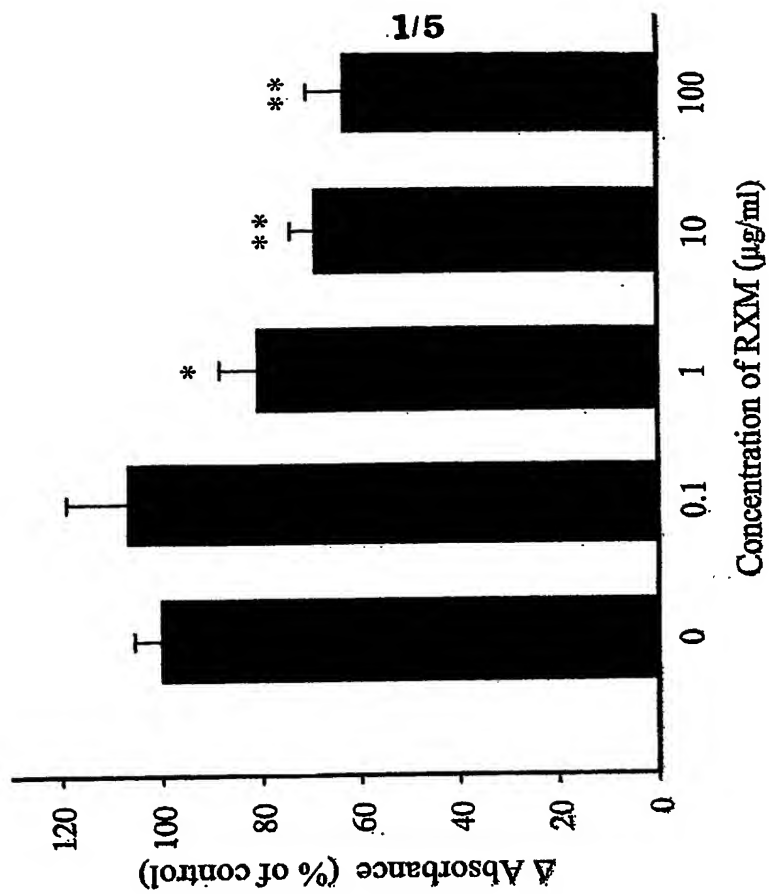


Figure 1B.

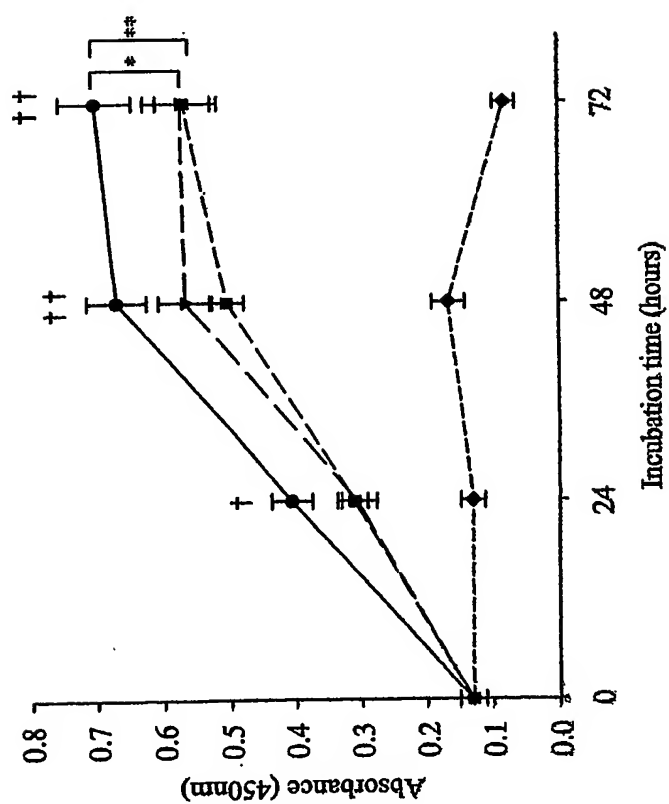


Figure 1A.

2/5

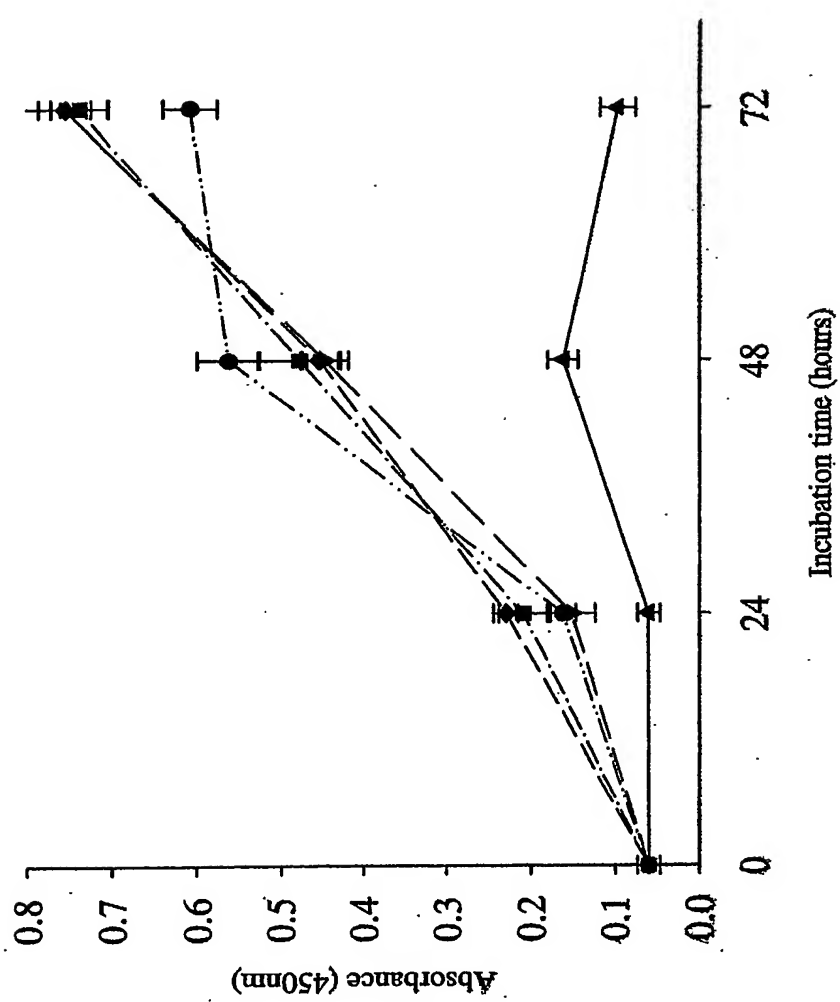


Figure 2.

3/5

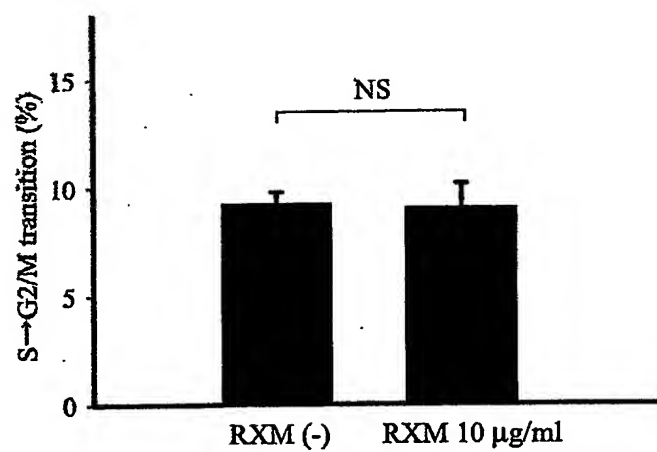
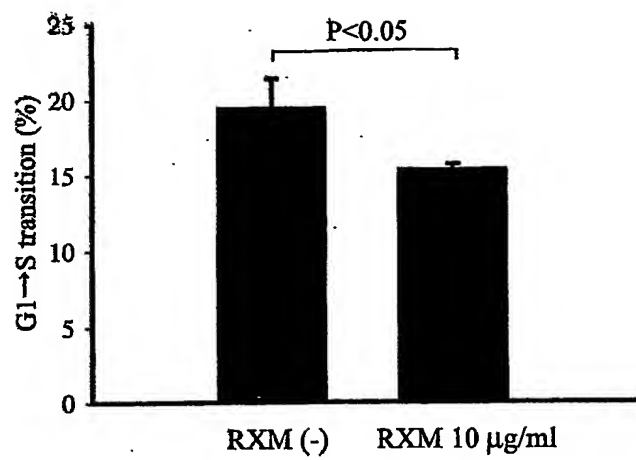
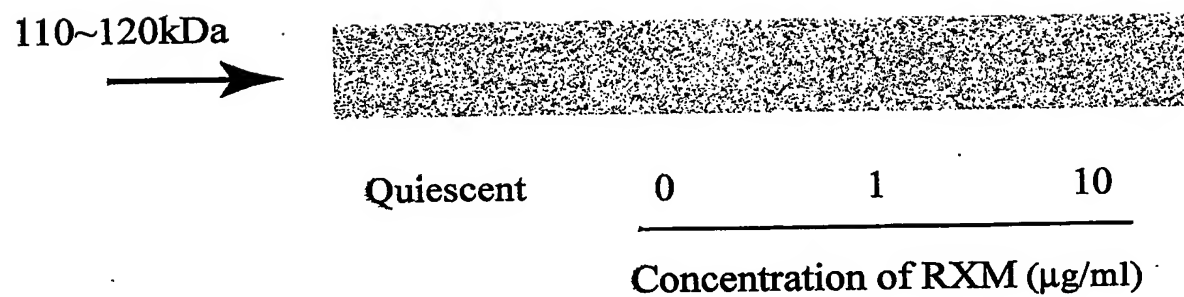


Figure 3

4/5

Figure 4



5/5

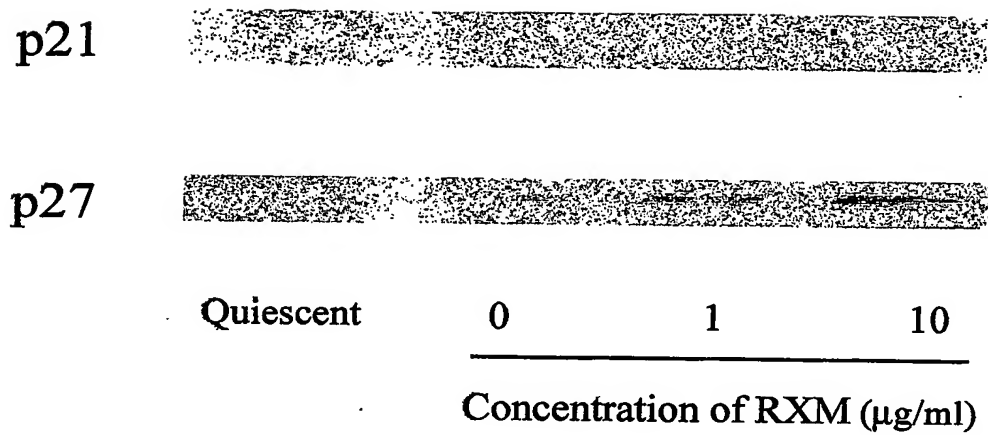


Figure 5.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003598

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07H17/08, A61K31/7048, A61P9/00, 9/10, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07H17/08, A61K31/7048

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	JP 2004-99604 A (Eisai Co., Ltd.), 02 April, 2004 (02.04.04), Full text (Family: none)	1-12
X	JP 11-209290 A (Hoechst Marion Roussel Ltd.), 03 August, 1999 (03.08.99), Full text (Family: none)	1-12
X	JP 2001-523644 A (Hoechst Marion Roussel Ltd.), 27 November, 2001 (27.11.01), Full text & WO 99/25365 A1 & EP 1030673 A1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 May, 2004 (07.05.04)

Date of mailing of the international search report  
25 May, 2004 (25.05.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003598

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-508738 A (Pfizer Inc.), 19 March, 2002 (19.03.02), Full text & WO 98/17280 A1 & EP 952835 A1	1-12
A	JP 8-505136 A (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 June, 1996 (04.06.96), Claims & WO 94/14443 A1 & US 5648351 A	1-12



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/003598

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13 to 21  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 13 to 21 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07H17/08, A61K31/7048, A61P9/00, 9/10, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07H17/08, A61K31/7048

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EX	J P 2004-99604 A (エーザイ株式会社) 2004. 04. 02, 全文 (ファミリーなし)	1-12
X	J P 11-209290 A (ヘキスト・マリオン・ルセル) 1999. 08. 03, 全文 (ファミリーなし)	1-12
X	J P 2001-523644 A (ヘキスト・マリオン・ルセル) 2001. 11. 27, 全文 & WO 99/25365 A1 & EP 1030673 A1	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 05. 2004

国際調査報告の発送日

25. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

関 政立

4 C

8619

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-508738 A (ファイザー アイエヌシー) 2002.03.19, 全文 & WO 98/17280 A1 & EP 952835 A1	1-12
A	JP 8-505136 A (藤沢薬品工業株式会社) 1996.06.04, 特許請求の範囲 & WO 94/144 43 A1 & US 5648351 A	1-12

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13-21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
人の身体の治療による処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。